(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 934849 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
**PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG**
**PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC**

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 934849

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification ($IPC^6$)
A61K 31/725

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **01.05.1992**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **02.11.1993**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **31.12.1993**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **01.05.1992 PCT/US1992/003626**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

02.05.1991 IL 98028 28.05.1991 IL 98298

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •**Yeda Research and Development Co. Ltd,** P.O. Box 95, 76100 Rehovot, ISRAEL, (IL)
2 •**Cohen, Irun R.,** 11 Hankin Street 76100 Rehovot, Israel, ISRAEL, (IL)
3 •**Lider, Ofer,** 21 Gordon Street 76100 Rehovot, Israel, ISRAEL, (IL)
4 •**Hershkoviz, Rami,** 2 Yigal Alon Street 46100 Herzliyya, Israel, ISRAEL, (IL)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •**Cohen, Irun Robert,** Rehovot, ISRAEL, (IL)
2 •**Lider, Ofer,** Israel, ISRAEL, (IL)
3 •**Hershkoviz, Rami,** Israel, ISRAEL, (IL)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

**Berggren Oy Ab,** Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
**Koostumuksia patologisten prosessien estämiseen ja/tai hoitoon**

**Sammansättningar för förhindrande och/eller behandlande av patologiska processer**

# Koostumukset estämään ja/tai hoitamaan patologisia prosesseja - Föreningar för förhindrande och/eller behandling av patologiska processer

Tämä keksintö koskee farmaseuttisia koostumuksia estämään ja/tai hoitamaan patologisia prosesseja, joihin liittyy Tumor Necrosis Factor alfan (TNF-α) erittymisen induktio, mihin sisältyy, että annetaan tehokas alhainen annos pienimolekyylipainoista hepariinia (LMWH) 5-8 d välein.

Keksinnön mukaisesti käytettyjen LMWH:n keskimääräinen molekyylipaino on noin 3000 - noin 6000 ja inhiboivat lepäävien T-solujen ja/tai makrofaagien TNF-α-eritystä in vitro vasteena T-solu-spesifisten antigeenien, T-solumitogeenien, makrofaagiaktivaattorien, revenneen solunulkopuolisen matriisin (dECM), fibronektiinin, laminiinin tai muiden ECM-komponenttien aiheuttamalle aktivaatiolle.

TNF-α, sytokiini, jota monosyytit (makrofaagit) ja T-lymfosyytit tuottavat, on avainelementti tekijöiden, jotka tuottavat tulehduksellisen vasteen, syöksyportaikossa ja sillä on monia pleiotroofisia vaikutuksia tautitilojen pääorkesteraattorina (B. Beutler ja A. Cerami, Ann. Rev. Immunol. (1989) 7:625-655).

TNF-α:n biologiset vaikutukset riippuvat sen pitoisuudesta ja tuottamiskohdasta: alhaisissa pitoisuuksissa TNF-α saattaa tuottaa toivottuja homeostaattisia ja puolustustoimintoja, mutta korkeissa pitoisuuksissa, systeemisesti tai tietyissä kudoksissa TNF-α voi yhteisvaikuttaa muiden sytokiinien kanssa, varsinkin interleukiini-1 (IL-1), pahentamaan monia tulehduksellisia vasteita.

Seuraavien aktiviteettien on osoitettu olevan TNF-α:n indusoimia (yhdessä IL-1:n kanssa); kuume, hidasaaltoinen uni, hemodynaaminen shokki, äkillisen faasin proteiinien tuoton lisääntyminen, albumiinin vähentynyt tuotto, ve-

risuonten endoteelisten solujen aktivointi, pääasiallisten histokompatiibelikompleksin (MHC) molekyylien lisääntynyt ekspressio, vähentynyt lipoproteiinilipaasi, vähentynyt sytokromi P450, vähentynyt plasman sinkki ja rauta, fibroplastin lisääntyminen, kohonnut nivelnesteen solun kollagenaasi, kohonnut syklo-oksygenaasiaktiivisuus, T-solujen ja B-solujen aktivaatio, sytokiinien, TNF-α:n itsensä, IL-1:n ja IL-6:n erityksen induktio.

Sitä kuinka TNF-α käyttää vaikutuksiaan, ei tiedetä yksityiskohtaisesti, mutta monien näiden vaikutusten uskotaan liittyvän TNF-α:n kykyyn stimuloida soluja tuottamaan prostaglandiineja ja leukotrieenejä solumembraanin maapähkinähaposta.

TNF-α johtuen sen pleiotroofisista vaikutuksista, on vedetty mukaan lukuisiin patologisiin tiloihin kehon monissa erilaisissa elimissä. Verisuonissa TNF-α edistää verenvuotoon liittyvää shokkia, säätelee endoteelisen solun trombomodulin alas ja lisää prokoagulointiaktiivisuutta. Se aiheuttaa valkoisten verisolujen adheesion ja mahdollisesti verihiutaleiden verisuonten seiniin ja siten saattaa edistää prosesseja, jotka johtavat valtimoiden kovettumiin, samoin kuin suonen tulehdukseen.

TNF-α aktivoi verisolut ja aiheuttaa neutrofiilien, eosinofiilien, monosyyttien/makrofaagien ja T- ja B-lymfosyyttien adheesion. Indusoimalla IL-6 ja IL-8 TNF-α lisää tulehduksellisten solujen kemotaksisuutta ja niiden tunkeutumista kudoksiin. Täten TNF-α:llä on osuus autoimmuunisairauksien, allergioiden ja siirrännäisen hyljinnän kudoksen vauriossa.

TNF-α:aa on myös kutsuttu näivettäjäksi, koska se moduloi rasvasolujen metabolista aktiivisuutta ja myötävaikuttaa syöpää, kroonisia infektioita, kroonista sydämen vajaatoimintaa ja kroonista tulehdusta seuraavaa surkastumista

ja kuihtumista. TNF-α:lla voi olla myös osuus anorexia nervosassa inhiboimalla ruokahalua samalla lisäten rasvakudoksen surkastumista.

TNF-α:lla on metabolisia vaikutuksia luustoon kiinnittyneeseen ja sydänlihakseen. Sillä on myös merkittäviä vaikutuksia maksaan: se alentaa albumiinin ja sytokromi P-450:n metabolismia ja lisää fibrinogeenin α1-happoglykoproteiinin ja muiden akuutin faasin proteiinien tuottoa. Se voi myös aiheuttaa suolen kuoliota.

Keskushermostossa TNF-α ylittää veri-aivorajan ja indusoi kuumeen, lisääntyneen unen ja anorexian. Lisääntynyt TNF-α-pitoisuus liittyy multippeliskleroosiin. Se aiheuttaa edelleen lisämunuaisen verenvuodon ja vaikuttaa steroidihormonien tuottoon, lisää kollagenaasia ja PGE-2:ta iholla ja aiheuttaa luun ja ruston murtumisen aktivoimalla luun syöjäsolut.

Lyhyesti, TNF-α liittyy autoimmunisaatiosairauksien, siirrännäisen hylkimisen, suonen tulehduksen ja valtimon haurauskovetustaudin monien ei-toivottujen tulehduksellisien tilojen taudinsyntyyn. Sillä saattaa olla osuuksia sydämen toiminnanvajavuudessa, vasteessa syöpään ja anorexia nervosassa. Näiden syiden takia on etsitty keinoja säädellä TNF-α-eritystä keinona kontrolloida sairauksien moninaisuutta.

Immuunisysteemin päätoiminta on suojella yksilöä vieraiden hyökkääjien, kuten mikro-organismit, infektiota vastaan. Se voi kuitenkin hyökätä myös yksilön omiin kudoksiin johtaen patologisiin tiloihin, jotka tunnetaan autoimmuunisairauksina. Yksilön immuunisysteemin agressiiviset reaktiot muiden yksilöiden kudoksia vastaan ovat syitä siirrettyjen elinten ei-haluttujen hylkimisten takana. Systeemin liikareaktiivisuus vieraita aineita vastaan aiheuttaa allergiaa antaen oireita, kuten astma,

nuha ja ihottuma.

Solut, jotka hallitsevat näitä reaktioita, ovat lymfosyyttejä, pääasiallisesti aktivoidut T-lymfosyytit ja patologinen tulehduksellinen vaste, jota ne osoittavat, riippuu niiden kyvystä liikennöidä verisuonen seinien läpi niiden kohdekudokseen ja takaisin. Täten vähentämällä lymfosyyttien kykyä tarttua ja läpäistä verisuonen seinät saattaa estää autoimmuunihyökkäyksen, siirrännäisen hylkimisen ja allergian. Tämä edustaisi uutta terapeuttista periaatetta, joka todennäköisesti johtaa parempaan tehokkuuteen ja vähentyneisiin epäedullisiin reaktioihin verrattuna nykyään käytettyihin terapioihin.

Valtimon kovetustauti ja suonen tulehdus ovat kroonisia ja akuutteja esimerkkejä patologisesta suonen tulehduksesta. Valtimon kovetustauti sisältää valtimoiden suonen sisäkalvon paksunemisen ja jäykkyyden johtaen sepelvaltimon sairauksiin, sydäninfarktiin, aivoinfarktiin, ääreisverisuonten sairauksiin ja edustaa pääasiallista sairastuvuuden ja kuolleisuuden syytä läntisessä maailmassa. Patologisesti valtimon kovetustauti kehittyy hitaasti ja kroonisesti vammana, jonka aiheuttaa rasva- ja kalkkipitoiset saostumat. Sidekudoksisten kudoksien lisääntyminen johtaa lopulta akuuttiin tilaan tuottaen äkillisen verisuonen aukon tukkeuman.

TNF-α:n on osoitettu helpottavan ja lisäävän ihmisen immuunikatoviruksen (HIV) replikaatiota in vitro (Matsuyama, T. et al., J. Virol. (1989) 63:(6): 2504-2509; Michihiko, S. et al., Lancet (1989) 1(8648): 1206-1207) ja stimuloivan HIV-1-geenin ekspressiota, täten mahdollisesti pannen alkuun kliinisen AIDS:n kehittymisen yksilöissä, jotka on piilevästi HIV-1-infektoituneita (Okamoto, T. et al., AIDS Res. Hum. Retroviruses (1989) 5(2): 131-138).

Hepariini on glykosaminoglykaani, polyanioninen sulfatoitu polysakkaridi, jota käytetään kliinisesti estämään veren hyytymistä veren hyytymistä estävänä aineena. Eläimessä on osoitettu hepariinimallien vähentävän autoimmuuni T-lymfosyyttien kykyä saavuttaa niiden kohde-elin (Lider, O. et al., Eur. J. Immunol. (1990) 20: 493-499). Hepariinin osoitettiin myös supressoivan kokeellista autoimmuunisairautta rotissa ja pidentävän allograftista selviytymistä ihon siirtämisen mallissa hiirissä, kun käytetään alhaisina annoksina (5 µg hiirille ja 20 µg rotille) injektoituna kerran päivässä (Lider, O. et al., J. Clin. Invest. (1989) 83: 752-756).

Mekanismeihin, jotka ovat havaittujen vaikutusten takana, ajatellaan sisältävän T-lymfosyyttien aiheuttaman entsyymi(e)n vapautumisen inhibiition, joka on tarpeellista suonen seinän läpäisyyn, pääasiallisesti entsyymi heparanaasi, joka spesifisesti hyökkää sub-endoteelisen solun ulkopuolisen matriisin (ECM), joka reunustaa verisuonia, glykosaminoglykaaniosaan (Naparstek, Y. et al., Nature (1984) 310: 241-243). Heparanaasientsyymin ekspressio liittyy autoimmuuni T-lymfosyyttien kykyyn tunkeutua verisuonen seinien läpi ja hyökätä aivoihin kokeellisessa autoimmuunisessa aivojen ja selkäytimen tulehduksen (EAE) mallisairaudessa.

Eurooppalainen patenttihakemus EP 0114589 (Folkman et al.) kuvaa koostumuksen estämään verisuonten kehittymistä nisäkkäissä, joissa aktiiviset aineet koostuvat olennaisesti (1) hepariinista tai hepariinifragmentista, joka on heksasakkaridi tai suurempi ja (2) kortisonista tai hydrokortisonista tai hydrokortisonin 11-α-isomeeristä. Esityksen mukaan hepariini itse tai kortisoni itse ovat tehottomia; vain molempien yhdistelmä antaa toivotut vaikutukset. Vaikka kirjallisuudessa ei ole näyttöä, että verisuonten kehittymisen ja autoimmuunisairauksien välillä ei ole yhteyttä, patenttihakemuksen sivulla 5 oleva ku-

vaus yhdistää verisuonten kehittymisen psoriasikseen ja niveltulehdukseen, osoittaen korkeiden annosten 25 000 yksikköä - 47 000 yksikköä hepariinia/d käytön.

Horvath, J.E. et al., Aust. N.Z.J. Med. (1975) 5(6): 537-539 kuvaa ihonalaisen hepariinin subantikoagulanttiannosten vaikutuksen aikaiseen munuaisten allograftiseen toimintaan. Päivittäinen annos on korkea (5000 U) ja tutkimuksen lopputulos on, että hepariinin subantikoagulanttiannoksilla ei ole vaikutusta aikaiseen siirrännäistoimintaan tai siirrännäisen selviytymiseen ja että se saattaa liittyä yhteen kohonneiden verenvuotokomplikaatioiden kanssa.

Toivanen, M.L. et al., Meth. and Find. Exp. Clin. Pharmacol. (1982) 4(6):359-363 tutkivat hepariinin vaikutusta korkeana annoksena (1000 U/rotta) adjuvantti niveltulehduksien inhibiitioon rotissa ja havaitsivat että hepariini lisäsi rotan adjuvantti niveltulehduksen kovuutta.

PCT-patentti: hakemus PCT/AU88/00017, joka on julkaistu numerolla nro. WO88/05301 (Parish et al.) kuvaa sulfatoituja polysakkarideja, jotka blokkaavat tai inhiboivat endoglykosylaasiaktiivisuutta, kuten heparanaasiaktiivisuus, käytettäväksi etäispesäkkeitä vastaan ja tulehdusta vastaan olevina aineina. Hepariinilla ja hepariinijohdannaisilla, kuten perjodaatti-hapetetut, pelkistetyt hepariinit, joilla oli merkityksetön antikoagulanttiaktiivisuus, osoitettiin olevan etäispesäkkeitä vastaan ja tulehdusta vastaan olevaa aktiivisuutta, kun käytettiin annoksina, jotka olivat alueella 1,6-6,6 mg/rotta päivittäin, annettuna jatkuvana infuusiona (vastaten 75-308 mg päivittäin aikuiselle ihmispotilaalle).

Tämä keksintö koskee farmaseuttisia koostumuksia estämään ja/tai hoitamaan patologisia prosesseja, joihin liittyy TNF-α-erityksen induktio koostuen farmaseuttisesti aktii-

visesta kantajasta ja pienimolekyylipainoisesta hepariinista (LMWH), jota on pienenä tehokkaana annoksena annettavaksi noin 5-8 d välein ja mikä LMWH kykenee inhiboimaan in vitro TNF-α eritystä lepäävillä T-soluilla ja/tai makrofaageilla vasteena T-solu-spesifisten antigeeneille, mitogeeneille, makrofaagiaktivaattoreille, revenneelle solunulkopuoliselle matriisille (dECM), lamiinille, fibronektiinille tai muille ECM-komponenteille.

Tämän keksinnön erityisessä suoritusmuodossa farmaseuttisen koostumuksen LMWH:n keksimääräinen molekyylipaino on noin 3000 - noin 6000 ja lisäksi voidaan antaa joka 5. tai 7. päivä.

Tämän keksinnön tarkoitus on myös antaa farmaseuttiset koostumukset annettaviksi noin 5-8 d välein estämään ja/tai hoitamaan patologisia prosesseja, joihin liittyy TNF-α-erityksen induktio koostuen farmaseuttisesti aktiivisesta kantajasta ja pienimolekyylipainoisesta hepariinista (LMWH), jota on pienenä tehokkaana annoksena ja mikä LMWH kykenee inhiboimaan kokeellisesti viivästyneen tyyppiset liiallisen ärsykeherkkyyden (DTH) reaktiot annettavalle antigeenille, mikä on osoitettu kovettuman, joka havaittiin antigeenin iholle antamisen jälkeen 5-7 d farmaseuttisen koostumuksen antamisen jälkeen, vähenemisenä, verrattuna kovettumaan, joka havaittiin antigeenin iholle antamisen jälkeen farmaseuttisen koostumuksen puuttuessa tai sen antamisesta selviytymisen jälkeen. Esimerkkeihin annetuista antigeeneistä kuuluu, mutta ei rajoitu, tetanus, myeliiniemäsproteiini, puhdistettu proteiinijohdannainen ja sen kaltaiset.

Lisäksi tämän keksinnön tarkoitus on antaa farmaseuttinen koostumus, jota voidaan antaa millä tahansa tavalla, kuten käsillä oleva tietty antaminen sanelee, mihin sisältyy mutta ei rajoitu, suolistoon liittyvä antaminen (suun kautta mukaanluettuna) tai ruoansulatuskanavan ulkopuoli-

nen antaminen (paikallinen tai sisäänhengitys aerosolien avulla). Edullisissa suoritusmuodoissa tämän keksinnön farmaseuttiset koostumukset annetaan ihonalaisesti tai laskimonsisäisesti.

Täten tämä keksintö on hyödyllinen, esimerkiksi viivästyttämään tai estämään allograftista hylkimistä ja hoitamaan tai estämään suurta määrää patologisia prosesseja, kuten sellaiset jotka liittyvät autoimmuunisairauksiin, allergiaan, tulehduksellisiin sairauksiin (erityisesti tulehduksellinen suolisairaus) tai immuunikato (AIDS). Tämä keksintö on myös hyödyllinen hoidettaessa sokeritauti tyyppi I:tä, hammasta ympäröivää sairautta, silmän keskikalvon tulehdusta, reumaattisia sairauksia (erityisesti nivelreuma), valtimoiden kovettumista, suonen tulehdusta tai multippeliskleroosia.

Tämän keksinnön farmaseuttisissa koostumuksissa on alhaiset tehokkaat annokset määrättyä LMWH:ta ja tyypillisesti on yksittäinen alhainen annosyksikkö vähemmän kuin 5 mg LMWH:ta, edullisesti noin 0,3 - noin 3 mg ja edullisimmin yksittäinen alhainen annosyksikkö 1-1,5 mg.

Tämä keksintö tarkastelee myös laajasti menetelmää käyttää pienimolekyylipainoista hepariinia (LMWH), joka kykenee inhiboimaan in vitro TNF-$\alpha$ eritystä lepäävillä T-soluilla ja/tai makrofaageilla vasteena T-solu-spesifisille antigeeneille, mitogeeneille, makrofaagiaktivaattoreille, revenneelle solunulkopuoliselle matriisille (dECM), lamiinille, fibronektiinille tai muille ECM-komponenteille farmaseuttisen koostumuksen valmistettamiseksi annettavaksi noin 5-8 d välein estämään ja/tai hoitamaan patologisia prosesseja, joihin liittyy TNF-$\alpha$-erityksen induktio, mihin menetelmään sisältyy yhdistää alhainen tehokas annos LMWH:ta farmaseuttisesti aktiivisen kantajan kanssa.

Tämän keksinnön vielä eräs tarkoitus on antaa menetelmä hoitaa kohdetta, joka kärsii patologisesta prosessista, mihin sisältyy TNF-α-erityksen induktio, joka koostuu farmaseuttisen koostumuksen antamisesta kohteelle, kuten edellä kuvattiin, noin 5-8 d välein.

Tämän keksinnön muut tarkoitukset ilmenevät ammattimiehille seuraavan esityksen lisäkatsauksen jälkeen, mukaanluettuna keksinnön spesifisten suoritusmuotojen yksityiskohtaiset kuvaukset.

Tämän keksinnön mukaisesti havaittiin, että käsittely pienimolekyylipainoisilla hepariineilla (LMWH) inhiboi T-solujen ja makrofaagien aktiivisuutta erittää TNF-α:aa. Tämän vaikutuksen toiminnallinen ilmeneminen voidaan nähdä hiirissä ja ihmisissä viivästyneen tyyppisten liikaherkkyys- (DTH) reaktoiden inhibiitiossa, tulehduksellinen reaktio, jonka solut, joihin sisältyy makrofaageja ja muita tulehduksellisia soluja, laukaisevat. Käsittely LMWH:n kanssa annoksilla, jotka vaikuttivat TNF-α-tuottoon, kykeni myös inhiboimaan autoimmuuni niveltulehduksen mallin, jota kutsutaan ajduvantti niveltulehdukseksi (AA). LMWH-käsittely myös pidensi allogeenisten sydänsiirrännäisten selviämistä rotissa ja ehkäistyn insuliiniriippuvaisen sokeritaudin (IDDM) NOD-hiirissä. Lisäksi käsittely LMWH:lla esti T-solujen ja makrofaagien TNF-α-tuoton induktion vasteena tuhoutuneen verisuonten sisäkerroksen alaisen solunulkopuolisen matriisin (ECM) stimulaatiolle. Koska TNF-α:lla on mahdollisesti osuus verisuonen vaurion kohdassa valtimoiden kovettumisprosessissa, TNF-α:n inhibiitio tuhoutuneen verisuonten sisäkerroksen alaisen ECM:n kohdassa parantaa valtimoiden kovettumisen patologisen prosessin. Yllättävin näkökohta käsiteltäessä LMWH:lla on, että sellainen käsittely on tehokkain annettuna pieninä annoksina viikon välein. Korkeat LMWH-annokset tai LMWH-annokset annettuna päivittäin eivät ole tehokkaita inhiboimaan TNF-α-eritystä tai im-

muunireaktoita.

Pienimolekyylipainoiset hepariinit, joita tuotetaan hepariinien fraktioinnilla tai kontrolloidulla depolymerisaatiolla, osoittavat parantunutta verenhyytymistä estävää suoritusta, mutta myös erilaisia farmakokineettisiä ominaisuuksia verrattuna hepariiniin: puoliintumisaika on kaksinkertaistunut ja biosaatavuus on korkeampi suhteessa niiden antikoagulaatiovaikutusta vastaan ihonalaisen injektion jälkeen (Bratt, G. et al. Thrombosis and Haemostasis (1985) 53:208; Bone, B. et al., Thrombosis Research (1987) 46:845).

Tämän keksinnön mukaisesti on nyt havaittu, että LMWH:t annettuna subantikoagulanttiannoksina usean d välein, ovat tehokkaita estämään ja/tai hoitamaan patologisia prosesseja, joihin sisältyy TNF-α-induktio.

LMWH:t, joita on tarkoitus käyttää keksinnön mukaisesti, ovat johdetut LMWH:sta, joiden keskimääräinen molekyylipaino on 3000-6000, kuten esimerkiksi LMWH:t, jotka esitettiin eurooppalaisessa patentissa EP 0014184. Joitakin LMWH:ta on kaupallisesti saatavilla erilaisilla tavaramerkeillä, esim. Fragmin®, Fraxiparin®, Fraxiparine®, Lovenox®/Clexane®.

LMWH:ta voidaan tuottaa monin eri tavoin: rikastaminen etanolilla ja/tai molekyyliseulalla fraktioimalla, esim. LMWH:n, jota on standardihepariinissa, geelisuodatus tai membraanisuodatus, ja kontrolloitu kemiallinen (typpihapolla, ß-eliminaatio tai perjodaattihapetus) tai entsymaattinen depolymerisaatio. Depolymerisaaation olosuhteet voidaan varovasti kontrolloida tuottamaan tuotteita, joilla on toivotut molekyylipainot. Typpihappodepolymerisaatiota käytetään yleisesti. Myös hepariinin bentsyyliesterin depolymerisaatiota ß-eliminaatiolla käytetään, mikä tuottaa saman tyyppisiä fragmentteja kuin entsymaat-

tinen depolymerisaatio käyttämällä hepariineja. LMWH, jolla on alhainen antikoagulanttiaktiivisuus, ja joka pitää kemiallisen perusrakenteen, voidaan valmistaa depolymerisaatiolla käyttämällä perjodaattihapetusta tai poistamalla LMWH:n antitrombiinia sitova fraktio, joka on valmistettu muilla menetelmillä käyttämällä immobilisoitua antitrombiinia adsorptioon.

Fragmin$^{R}$ on pienimolekyylipainoinen hepariini, jonka keskimääräinen molekyylipaino on alueella 4000-6000 d, joka on tuotettu natriumhepariinin kontrolloidulla typpihappodepolymerisaatiolla porsaan suolen limakalvosta. Kabi Pharmacia, Ruotsi, valmistaa sitä nimellä Fragmin$^{R}$ käytettäväksi antitrombiiniaineena suolaliuoksina injektoimaan 2500 IU/0,2 ml ja 5000 IU/0,2 ml yksittäisinä annosruiskuina, vastaten noin 16 mg ja 32 mg, vastaavasti.

Fraxiparin$^{R}$ ja Fraxiparine$^{R}$ ovat LMWH:ta, joiden keskimääräinen molekyylipaino on noin 4500 daltonia, joka on tuotettu kalsiumhepariinin fraktioinilla tai kontrolloidulla typpihappo depolymerisaatiolla, vastaavasti porsaan suolen limakalvosta. Sanofi (Choay Laboratories) valmistaa sitä käytettäväksi antitromboottisena aineena yksittäisinä annoksina, sisältäen noin 36 mg, vastaten 3075 IU/0,3 ml vettä.

Lovenox$^{R}$ (Enoxaparin/e), LMWH-fragmentti, joka on tuotettu kalsiumhepariinin depolymerisaatiolla, porsaan suolen limakalvosta käyttämällä ß-eliminaatiota, Pharmuka SF, Ranska valmistaa ja Rhone-Poulenc jakaa sitä nimillä Clexane$^{R}$ ja Lovenox$^{R}$ käytettäväksi antitromboottisena aineena yksittäisinä annosruiskuina sisältäen 20 mg/0,2 ml ja 40 mg/0,4 ml vettä.

Kuten tässä esityksessä osoitetaan, LMWH:n kuvatut uudet ominaisuudet ovat kaikkien LMWH:n yhteisiä piirteitä riippumatta valmistusprosessista, rakenteellisista ero-

avaisuuksista (depolymerisaation luomia tai sellaiset, jotka riippuvat raaka-aineena käytetyn hepariinin muunnoksesta) tai antikoagulaatioaktiivisuudesta edellyttäen että käytetty LMWH kykenee inhiboimaan TNF-α-erityksen in vitro lepäävillä T-soluilla ja/tai makrofaageilla vasteena aktivaatioon, jonka aiheutti kosketus spesifisten antigeenien, mitogeenien, revenneen ECM:n tai sen proteiinikonponenttien kanssa, kuten fibrinektiini tai laminiini, kanssa.

Toinen hyödyllinen testi tunnistamaan LMWH:t, jotka ovat tehokkaita tämän keksinnön tarkoitukseen, on kokeellisten viivästynyttä tyyppiä olevien liikaherkkyys (DTH) ihoreaktioiden, T-lymfosyytti-riippuvaisen reaktion, lukuisia antigeenejä vastaan (esimerkiksi tetanus-antigeeni, myeliiniemäsproteiini (MBP), puhdistettu proteiinijohdannainen (PPD) ja oksatsoloni) inhibiitio. LMWH:t inhiboivat myös T-soluadheesiota ECM:ään ja sen proteiinikomponentteihin.

LMWH:t, jotka ovat tehokkaita keksinnön mukaisesti, ovat mukana farmaseuttisissa koostumuksissa, esimerkiksi vesiliuoksina, sisältäen mahdollisesti natriumkloridia, stabilisaattoreita ja muita sopivia ei-aktiivisia ainesosia. Edullinen tapa on antaa injektiolla, ihon alaisesti tai laskimonsisäisesti, mutta keksintö sulkee sisäänsä minkä muun tahansa sopivan antamistavan.

Keksinnön mukaisesti LMWH:ta annetaan 5-8 d välein, edullisesti kerran viikossa.

Häiriöt, joita voidaan estää tai hoitaa keksinnön mukaisesti, ovat kaikki häiriöitä, jotka liittyvät patologisiin prosesseihin sisältäen TNF-α-erityksen induktion, mukaanluettuna valtimoiden kovettuminen ja suonen tulehdus ja niihin liittyneet patologiset prosessit; autoimmuunisairaudet, esim. nivelreuma, sokeritauti tyyppiä I

(IDDM); allergia; siirrännäisen hyljintä; akuutit ja krooniset tulehdukselliset sairaudet, esim. silmän keskikalvon tulehdus, suolen tulehdus; anorexia nervosa; verenmyrkytyksen aiheuttama verenvuotoon liittyvä shokki ja tartuntataudit AIDS:lle alttiiksi saatetuissa yksilöissä. AIDS:ssa LMWH:t supressoivat HIV-replikaatiota ja/tai lisäävät resistenssiä tartuntatauteja vastaan täten estäen AIDS:iin liittyvän kompleksin kehittymistä (ARC= AIDS related complex).

Tämän keksinnön mukaisesti on havaittu, että LMWH:lla voi olla kapea tehokkuuden annosalue ja että LMWH:n erilaiset valmisteet voivat osoittaa erilaisia optimaalisia biologisia tehoja. Siksi on tarpeellista saada aikaan yksikköannos LMWH-valmisteelle käytettäväksi keksinnön mukaisesti, mainitun yksikköannoksen perustuessa hiiristä, joita on käsitelty LMWH:lla, saatujen hiiren pernasolujen TNF-α-erityksen inhibiition bioamäritykseen tai DTH-reaktiivisyyden inhibiitioon LMWH:lla. Havaittiin, että tietyn LMWH-annoksen kyky inhiboida TNF-α-eritystä korreloi positiivisesti sen kyvyn kanssa inhiboida viivästyneen tyyppistä liikaherkkyys- (DTH) reaktiota. Tämä solun välittämä tulehduksellinen reaktio in vivo on tärkeä, koska se on autoimmuunisairauksissa, siirrännäisen hylkimisessä, jonkin tyyppisessä verisuonitulehduksessa ja allergiassa mukana olevien prosessien ilmeneminen.

Keksinnön mukaisesti osoitettiin, että alhaisinta annosta LMWH:ta/kg, joka aiheuttaa TNF-α-inhibiition, DTH-reaktiivisyyden tuoton tai inhibiition vähintään 50 %:lla, katsotaan muodostavan 12 hiiren inhibiittoriyksiköt/kg (12 u/kg). Johtuen eroista pinta-alassa ja metaboliassa hiirten ja ihmisten välillä, pitäisi ihmisiä käsitellä alemmalla LMWH-annoksella ja 12 u/kg hiiressä arvellaan vastaavan 1 u/kg ihmisissä. Esimerkiksi annos Fragmin$^{R}$:a panos 38609, joka on tehokas inhiboimaan sekä TNF-α-eritystä että DTH-reaktiivisyyttä, on 5 μg/hiiri annettuna

viikottain. Koska jokainen hiiri painaa noin 25 g, annos Fragmin® 38609:ta, joka vastaa 12 u/kg, on 200 µg/kg hiiriä. 1 u/kg annos, joka on sopiva ihmisille, on siksi 200 µg/kg: 12= 16,67 µg/kg. Ihmistä, joka painaa noin 70 kg, voitaisiin siten käsitellä noin 1,2 mg annoksella annettuna yksittäisenä annoksena ihon alaisesti kerran joka 7. päivä. Koska yksittäiset ihmiset eroavat biologisesti, saattaa optimaalinen annos olla erilainen noin 1,2 mg:sta ja olla alle 5 mg, erityisesti alueella 0,3-3 mg.

LMWH-annos, jonka pitäisi olla tehokas rotissa, voidaan johtaa tosiasiasta että LMWH-annos/kg rottia on puolet annoksesta/kg hiiriä, s.o. 6 u/kg. Esimerkiksi jos 12 u Fragmin® panos 38609:ta on 200 µg/kg, niin 6 u annos sopiva rotille pitäisi olla 100 µg/kg tai 20 µg/200 g rottaa, annettuna kerran viikossa.

Keksintöä kuvataan nyt seuraavilla ei-rajoittavilla esimerkeillä.

Esimerkit

Esimerkki 1

TNF-α-erityksen inhibiition määritys

Pernasolujen, joita viljeltiin LMWH:n läsnäollessa tai puuttuessa, tai pernasolujen, jotka saatiin hiiristä, joita oli käsitelty tai ei oltu käsitelty LMWH:lla in vivo, supernatanteista analysoidaan niiden kyky erittää TNF-α:aa. TNF-α biomääritys perustuu TNF-α:n sytotoksiseen vaikutukseen sykloheksimidi (CHI)-herkistyneisiin soluihin ja sen määritykseen neutraalipunan sisäänottomäärityksellä, kuten Wallach D., J. Immunology (1984) 132: 2464-2469. Lyhyesti, TNF-α:n CHI-herkistettyjen He-La-solujen tappaminen, jota on solujen supernatanteissa, mitataan, TNF-α-pitoisuus mainituissa supernatanteissa määritetään vertaamalla TNF-α:n, jota on lisätty ulkopuolisesti, titrauskäyriin. Solun elinkelpoisuus määritetään

inkuboimalla neutraalipunan kanssa 2 h, pesemällä ylimääräinen väri pois, uuttamalla neutraalipuna, jonka solut ottivat sisään, Sörensin sitraattipuskuri-etanoliseoksella ja määrittämällä se kolorimetrisesti 570 nm:ssä Microelisa Autoreaderillä.

Solut hiiristä, joita käsiteltiin LMWH:lla, saatiin seuraavasti: naaraspuoliset BALB/c-kannan hiiret (25 g, 2 kk vanhoja), vähintään 5 hiirtä/ryhmä, injektoidaan ihonalaisesti erilaisilla LMWH-annoksilla, tavallisesti alueella 0,5-20 µg/hiiri. 5 d myöhemmin hiiret tapetaan kaulan sijoiltaan menolla, pernat poistetaan ja pernsolujen suspensioista, joista on punaverisolut käytetty, määritetään TNF-α-tuotto vasteena dECM-, Concanavalin A- (Con A) tai lipopolysakkaridi- (LPS) induktiolle.

ESimerkki 2
DTH-reaktiivisyyden inhibiition biomääritys

Hiirien ryhmä herkistetään ajeltuun vatsan ihoon 100 µl:lla 3 % oksatsolonia (OX) asetoni/oliiviöljyssä (4:1, v:v). DTH-sensitiivisyys tulee esiin 5 d myöhemmin seuraavsti: hiiret haastetaan 20 µl:lla 0,5 % OX:ää (10 µl kumpaankin korvan puoleen) asetoni/oliiviöljyssä. Vakioalue korvasta mitataan välittömästi ennen haastamista ja 24 ja 48 h myöhemmin Mitutoyo teknillisellä mikrometrillä. Henkilöltä, joka mittaa korvan turpoamisen, salataan hiiriryhmien identiteetti. Korvan turpoamisen lisääntyminen (Δ) ilmaistaan $10^{-2}$ mm tai $10^{-4}$ tuumaa (±SE) yksikköjen keskiarvona riippuen käytetystä mikrometristä. Inhibiitioprosentti lasketaan seuraavasti:

$$\% \text{ inhibiitio} = \frac{\text{pos. kontrolli-kokeellinen ryhmä}}{\text{pos. kontrolli-negatiivinen kontrolli}} \times 100$$

Hiiriä käsitellään LMWH:lla kuten esimerkissä 1, injektoitu päivä ennen primääristä herkistämistä OX:lle. Vii-

dentenä päivänä OX:lle herkistämisen jälkeen hiiret haastetaan indusoimaan DTH-reaktio, kuten edellä kuvattiin.

Positiivinen kontrolli on DTH-reaktio, joka on saatu esiin immunisoiduissa hiirissä LMWH-käsittelyn puuttuessa. Negatiivinen kontrolli on taustapaisuminen, jonka antigeeni immunisoiduissa hiirissä tuotti.

Esimerkki 3

TNF-α-erityksen induktio T-soluilla ja makrofaageilla in vitro

Mikrotiitterimaljat valmistettiin seuraavasti: fibronektiini (FN) tai laminiini (LN) (Sigma) lisättiin tasapohjaiseen 96 kaivon maljoihin (Costar) 1 µg/50µl PBS pitoisuutena/kaivo ja poistettiin 16 h kuluttua. Jäljelle jääneet sitomiskohdat blokattiin BSA/PBS:llä (10 mg/ml), mikä lisättiin kaivoihin 2 h:ksi ja pestiin pois. ECM-päällystetyt kaivot valmistettiin seuraavasti: viljeltiin vasikan sarveiskalvon endoteelisoluja tasapohjaisella 96 kaivon maljoilla. Konfluentit endoteelisolujen kerrokset liuotettiin ja ECM jätettiin koskemattomaksi solujätteestä (Gospodarowicz, D. et al. J. Biol. Chem. (1978) 253: 3736). Hajotettu ECM (dECM) valmistettiin raaputtamalla ECM:ää varovasti 3 kertaa 27G ruiskun neulalla ja ulostyöntyvät kohdat peitettiin myöhemmin BSA/PBS:llä. Lepäävät kloonatut rotan CD4+ T-solut, joita merkitään K1, jotka tunnistavat myeliiniemäsproteiinin (MBP), lisättiin ja ylläpidettiin viljelmässä ja lisättiin kaivoihin, $10^5$ solua/kaivo 3 x $10^5$ syngeenisten pernan makrofaagien kanssa tai ilman 100 µl:aan/kaivo RPMI 1640 (Gibco), johon oli lisätty 1 % BSA:ta ja antibiootteja. Pernan makrofaagit puhdistettiin poistamalla T- ja B-solut käyttämällä spesifisiä monoklonaalisia vasta-aineita (mAb). Milloin ilmaistu, anti-hiiri TNF-α mAb (Genzyme, laimennettu 1/300), lisättiin kaivoihin. MBP (100 µg/ml), Con A (2,5 µg/ml), LPS (1 µg/ml) lisättiin kaivoihin, missä

ilmoitettu. Maljoja inkuboitiin 37°C:ssa kostutetussa inkubaattorissa 3 h. Sen jälkeen kaivojen sisällöt (4 kaivoa/kokeellinen ryhmä) kerättiin, sentrifugoitiin ja alustoista määritettiin TNF-α-eritys kuten esimerkissä 1: viljeltyjen makrofaagien supernatantit ja lymfosyytit lisättiin HeLa-solujen viljelmiin, jotka ovat herkkiä TNF-α:n tappamiselle, ja näiden solujen kuolema testialustojen läsnäollessa kalibroitiin verrattuna ulkopuolisesti lisätyn TNF-α:n titrauskäyriin. Solukuolemaa tutkitaan esi-inkuboiduista HeLa-soluista vaputuneella neutraalipunavärillä. Tässä osoitetut tulokset edustavat materiaalia, joka saatiin yhteensä kuudesta kokeesta, jotka tuottivat olennaisesti samanlaiset tulokset.

Taulukko 1 osoittaa, että T-solut ja makrofaagit, joita viljeltiin yhdessä, voidaan indusoida erittämään TNF-α:aa saattamalla kosketuksiin spesifisen antigeeni MBP-ryhmän kanssa (ryhmä 4), mitogeeni Con A (ryhmä 6) tai LPS (ryhmä 8). Kuitenkin antigeenisen tai mitogeenisen ärsykkeen puuttuessa, indusoitiin myös TNF-α revenneen solunulkopuolisen matriisin (dECM; ryhmä 10) tai ECM-komponenttien fibronektiinin (FN; ryhmä 12) tai laminiinin (LN ryhmä 14) eritettäväksi. Koskematon ECM oli heikko TNF-α-indusoija (ryhmä 16).

Taulukko 1

T-solujen ja makrofaagien TNF-α-eritys indusoidaan spesifisillä antigeeni MBP-, Con A-, LPS- tai dECM-komponenteilla.

| Ryhmä | TNF-α-indusori | K1-solut, joita on viljelty yhdessä (kyllä) tai ilman (ei) makrofaageja | Eritetty TNF-α (pg/ml) |
|---|---|---|---|
| 1 | ei | ei | 50 |
| 2 | | kyllä | 65 |
| 3 | MBP-antig. | ei | 30 |
| 4 | | kyllä | 950 |
| 5 | Con A | ei | 120 |
| 6 | | kyllä | 1300 |
| 7 | LPS | ei | 50 |
| 8 | | kyllä | 1500 |
| 9 | dECM | ei | 30 |
| 10 | | kyllä | 900 |
| 11 | FN | ei | 20 |
| 12 | | kyllä | 650 |
| 13 | LN | ei | 50 |
| 14 | | kyllä | 500 |
| 15 | ECM | ei | 30 |
| 16 | | kyllä | 120 |

Esimerkki 4

TNF-α-erityksen säätely LMWH:lla

T-solu- ja lisäsoluviljelmät valmistettiin kuten esimerkissä 3 kuvattiin. LMWH:ta lisättiin kaivoihin soluviljelmän alussa. TNF-α-tasot tutkittiin 3 h inkubaation jälkeen.

Taulukko 2 osoittaa, että LMWH:n (Fragmin® panos 38609) läsnäolo in vitro inhiboi TNF-α-erityksen induktion, jonka spesifinen antigeeni (MBP; ryhmä 4), mitogeenit (Con A ja LPS; ryhmät 6 ja 8), dECM- tai ECM-komponentit (ryhmät 10, 12 ja 14) indusoivat. Koska TNF-α-eritys, jonka dECM

indusoi, liittyy todennäköisesti valtimon kovettumaan, on LMWH:n aiheuttama TNF-α:n inhibiitio valtimon kovettumassa edullinen.

Taulukko 2

LMWH (Fragmin$^R$ panos 38609) inhiboi TNF-α-erityksen induktion, joka indusoidaan in vitro.

| Ryhmä | TNF-α-indusori | LMWH (1 µg/ml) | T-solu- ja makrofaagiviljelmien TNF-α-eritys (pg/ml) |
|---|---|---|---|
| 1 | ei | ei | 65 |
| 2 | | kyllä | 30 |
| 3 | MBP-antig. | ei | 950 |
| 4 | | kyllä | 60 |
| 5 | Con A | ei | 1300 |
| 6 | | kyllä | 80 |
| 7 | LPS | ei | 1500 |
| 8 | | kyllä | 80 |
| 9 | dECM | ei | 900 |
| 10 | | kyllä | 90 |
| 11 | FN | ei | 650 |
| 12 | | kyllä | 90 |
| 13 | LN | ei | 500 |
| 14 | | kyllä | 70 |

Esimerkki 5

Jotta tutkittiin LMWH:n, jota annettiin hiirille in vivo, vaikutusta pernasolujen TNF-α-erityksen, suoritettiin seuraavat kokeet. BALB/c-hiiriä, 5/ryhmä, käsiteltiin erilaisilla LMWH-annoksilla (Fragmin$^R$ panos 38609), jotka oli laimennettu suolaliuokseen, injektoitu ihon alaisesti. 1 viikon kuluttua eläimet tapettiin ja niiden pernasoluista, joista puuttuivat punaiset verisolut, tutkit-

tiin niiden kyky erittää TNF-α:aa vasteena kontrollikaivoille ilman dECM:ää (A) tai kaivoille, jotka oli peitetty dECM:llä (B). TNF-α-erityksen tasojen mittaaminen tehtiin kuten on kuvattu esimerkissä 1. Taulukko 3 osoittaa tulokset, jotka osoittavat, että 5 μg LMWH-injektio annettuna kerran, 7 d aikaisemmin, inhiboi TNF-α-erityksen, jonka dECM oli indusoinut. Korkeammat tai matalammat LMWH-annokset olivat vähemmän tehokkaita. Täten optimaalinen annos LMWH:ta annettuna in vivo viikko aikaisemmin oli tehokas.

Taulukko 3

T-solun välittämän TNF-α-erityksen ex vivo inhibiitio vasteena revenneelle ECM:lle.

| | BALB/c-hiirien käsittely (viikottain) | Pernasolujen in vitro TNF-α-eritys (pg/ml) viljeltynä: A. Ei yhtään | B. Tuhoutunut ECM (% inhibiitio) | |
|---|---|---|---|---|
| 1 | ei yhtään | 30 | 400 | |
| 2 | 0,5 μg | 50 | 380 | (5) |
| 3 | 1 μg | 25 | 90 | (78) |
| 4 | 5 μg | 25 | 60 | (85) |
| 5 | 10 μg | 30 | 140 | (65) |
| 6 | 20 μg | 40 | 320 | (20) |

Taulukko 4 osoittaa, että 5 μg annos LMWH Fragmin$^{R}$ panos 38609:ää in vivo oli myös tehokas inhiboimaan LPS:n indusoimaa TNF-α-eritystä. BALB/c-hiiriä (4 hiirtä/koeryhmä) käsiteltiin osoitetuilla määrillä LMWH:ta, joka oli laimennettu suolaliuokseen ja injektoitiin ihonalaisesti. 1 viikon kuluttua hiiret injektoitiin vatsaontelon sisäisesti 10 mg:lla LPS:ää, tapettiin 4 h myöhemmin ja niiden pernasoluja, joista puuttuui punaiset verisolut, viljel-

tiin sen jälkeen dECM-peitetyillä kaivoilla 3 h kostutetussa inkubaattorissa. TNF-α-erityksen, joka oli vasteena dECM:ään, tasot mitattiin viljelmien supernatanteissa. Tulokset on annettu taulukossa 4.

Taulukko 4

Hiirien käsittely LMWH:lla inhiboi LPS:n välittämän makrofaagien TNF-α-erityksen.

| Hiirien LMWH-käsittely (μg) | Makrofaagienn in vitro TNF-α-eritys (pg/ml) vasteena LPS:lle | % Inhibiitio |
|---|---|---|
| 0 | 690 | -- |
| 0,1 | 500 | 28 |
| 1 | 350 | 50 |
| 5 | 120 | 82 |
| 20 | 550 | 20 |

Esimerkki 6

Jotta tutkitaan erilaisten LMWH:n vaikutusta TNF-α-erityksen inhibiitioon, käsiteltiin hiiriä osoitetulla LMWH:lla annettuna ihonalaisesti eri pitoisuuksina. 1 viikon kuluttua jotkut hiiristä tapettiin ja TNF-α-erityksen induktio vasteena Con A-aktivaatioon in vitro mitattiin. Jäljelle jääneistä hiiristä tutkittiin niiden kyky vastata oksatsoloni-antigeeniin. Tulokset on ilmaistu taulukossa 5 inhibiitio-prosenttina verrattuna käsittelemättömien hiirien LMWH:n vasteisiin.

Kaksi johtopäätöstä voidaan tehdä tarkastelemalla taulukossa 5 nähtyjä tuloksia:

1. LMWH:n eri panoksilla, joista jokainen on kalibroitu

samanlaisella antitromboottivaikutuksella (tekijä X-määritys), on erilaiset optimaaliset annokset inhiboimaan TNF-α-eritystä. Lisäksi on LMWH-valmisteita, kuten Clexane® panos 4096, jolla ei ole inhibiitiovaikutusta TNF-α-eritykseen millään yritetyllä annoksella. Siksi voidaan päätellä, että LMWH-valmisteen antitromboottinen vaikutus ei liity LMWH-valmisteen mahdollisuuteen inhiboida TNF-α-eritystä. Kaksi erilaista biomääritystä saadaan aikaan välittämällä erilaisilla tekijöillä, joita valmisteissa on läsnä.

2. Tietyn LMWH-annoksen kyky inhiboida TNF-α-eritystä korreloi positiivisesti sen kyvyn kanssa inhiboida DTH-eritystä ja LMWH-valmisteen annos, joka optimaalisesti on tehokas inhiboimaan TNF-α-eritystä, on myös optimaalisesti tehokas inhiboimaan DTH-reaktiota.

Taulukko 5
Hiirien käsittely erilaisilla LMWH:lla inhiboi sekä ex vivo TNF-α-erityksen että DTH-vasteet.

| Hiirien viikottainen käsittely LMWH:lla | Pitoisuus µg/hiiri | Ex vivo Con A indusoitu TNF-α-eritys pg/ml | % Inhibiitio | DTH-vasteet | % Inhibiitio |
|---|---|---|---|---|---|
| **Fragmin$^{R}$ panos** | | | | | |
| 38609 | Ei yhtään | 450 | - | 25 | - |
| | 0,5 | 425 | 5 | 21 | 12 |
| | 1 | 400 | 12 | 23 | 10 |
| | 5 | 68 | 85 | 6 | 73 |
| | 10 | 350 | 22 | 20 | 20 |
| | 50 | 435 | 8 | 26 | 0 |
| **Panos 45389** | Ei yhtään | 320 | - | 28 | - |
| | 0,1 | 280 | 13 | 26 | 6 |
| | 1 | 70 | 78 | 4 | 89 |
| | 5 | 260 | 18 | 24 | 13 |
| | 10 | 290 | 10 | 26 | 6 |
| | 50 | 310 | 4 | 29 | 0 |
| **Clexane$^{R}$ panos** | Ei yhtään | 400 | - | 22 | - |
| **088** | 0,1 | 360 | 10 | 17 | 23 |
| | 1 | 64 | 84 | 3 | 87 |
| | 5 | 152 | 38 | 13 | 41 |
| | 10 | 380 | 4 | 23 | 0 |
| **Panos 2066** | Ei yhtään | 350 | - | 23 | - |
| | 0,1 | 338 | 6 | 20 | 13 |
| | 1 | 185 | 54 | 8 | 65 |
| | 5 | 192 | 57 | 7 | 70 |
| | 10 | 186 | 55 | 7 | 70 |
| **Panos 4096** | Ei yhtään | 320 | - | 24 | 0 |
| | 1 | 335 | 0 | 27 | 0 |
| | 5 | 325 | 0 | 26 | 0 |
| | 10 | 330 | 0 | 24 | 0 |

Esimerkki 7

Adjuvantti niveltulehduksen (AA) käsittely rotissa alhaisilla LMWH-annoksilla

Adjuvantti niveltulehdus on kokeellinen sairaus, jota voidaan indusoida joissakin rottakannoissa immunisoimalla ne Mycobacterium tuberculosis antigeenejä vastaan (Pearson, C.M., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (1956) 91: 91). Tätä kokeellista sairautta pidetään ihmisen nivelreuman mallina (Pearson, C.M., Arthrit. Rheum. (1964) 7:89). T-lymfosyytit, jotka tunnistavat M. tuberculosis antigeenin, näyttävät aiheuttaneen niveltulehduksen, joka reagoi ristiin nivelkudosten rakenteiden kanssa (Cohen, I.R., et al., Arthritis Rheum. (1985) 28:841).

Lewis-rotat immunisoitiin M. tuberculosiksella (1 mg) öljyssä indusoimaan adjuvantti niveltulehdus (Pearson, C.M., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (1956) 91: 91). 5 d myöhemmin rotat ympättiin ihonalaisesti, kuten on osoitettu LMWH- ja/tai hepariini-annoksilla ja niveltulehduksen kehittyminen arvoitiin 0-16 asteikolla kuten on kuvattu (Holoshitz, Y., et al., Science (1983) 219: 56). Kaikki kokeet suoritettiin Fragmin$^{R}$:llä, panos 38609.

Jotta tutkittiin annosvastetta Fragmin$^{R}$:ään (kuvio 1), rotat, jotka oli immunisoitu indusoimaan AA, injektiin ihonalaisesti viikottain, aloittamalla 5:nä päivänä injektion jälkeen 0,5 µg (○), 1 µg (♦), 2 µg (●), 10 µg (◊), 15 µg (Δ) 20 µg (■); 30 µg (▲), 40 µg (x) ja PBS kontrolli (□). Annos oli maksimaalinen inhiboimaan niveltulehdusta.

Yhden 20 µg:n Fragmin$^{R}$-annoksen vaikutus AA:n kulkuun nähdään kuviossa 2: PBS-kontrolli (□); yksittäinen käsittely 5:nä päivänä (▲); päivittäin (•); joka 5. d (○); viikoittain (■). On osoitettu että Fragminin anta-

minen sekä 5 päivän välein että 7 päivän välein inhiboi niveltulehdusta.

Kuvio 3 osoittaa Fragmin®:n (panos 38609) viikottaisen antamisen tehon verrattuna standardi hepariinin vaikutukseen AA:han. Lewis-rotat immunisoitiin indusoimaan AA. Alkaen 5:nä päivänä rotat ympättiin ihonalaisesti viikon välein 20 µg Fragmin®-annoksella (•), hepariinilla (○) tai fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella (PBS) kontrolli (□). Tulokset osoittavat dramaattista eroa potenssissa Fragmin®:n ja hepariinin välillä: Fragmin® inhiboi täydellisesti niveltulehduksen, kun taas hepariinillä ei ollut inhibitoorista vaikutusta.

Annettuna päivittäin 20 µg LMWH-annoksella ei havaittu inhibitoorista vaikutusta AA:han, vaikka yllättäen hepariinin inhibitoorinen vaikutus oli voimakkaampi kuin Fragmin®:n päivittäin annettuna, kuten nähdään (kuviossa 4: Fragmin® (panos 38609) (•), hepariini (○), PBS-kontrolli (□).

Samanalainen inhibitoorinen vaikutus havaittiin useilla muilla LMWH:lla annettuina Lewis-rotille, jotka oli immunisoitu indusoimaan AA. Kuvio 5 osoittaa tulokset 20 µg Fraxiparin®-annoksen injektiosta (päivittäin (□); viikottain (■)); Fraxiparin® (päivittäin (Δ); viikottain (▲), Lovenox®/Clexane® (päivittäin (•); viikottain (○)) ja PBS-kontrolli (x). Kaikki kolme eri tyyppistä ja eri lähteistä olevaa LMWH:ta osoitti merkittävää niveltulehduksen inhibiitiota annettuna viikottain, mutta ei päivittäin.

Esimerkki 8

Käsittely LMWH:lla estää allograftisen hylkimisen

Wistar-rotat altistettiin allogeeniselle BN-sydänsiirrolle (Ono, K. ja Linsay, E.S., J. Thorac. Cardiovasc.

Sug. (1969) 45: 225-229). Päivästä ennen siirtämistä rotat injektoitiin ihonalaisesti 7 d välein 20 µg:lla Fragmin$^R$:ää tai PBS-kontrollia (kuvio 6, ♦ ja ◊, vastaavasti) ja selviäminen arvioitiin. Hylkimispäiväksi määritettiin päivä, jolloin siirretty sydän pysähtyi lyömästä, määritettynä vatsan tunnustelulla. Kuvio 6 osoittaa, että rotilla, joita käsiteltiin viikottaisella LMWH-annoksella, oli merkittävän kohonnut sydämen allograftien selviäminen.

Esimerkki 9

LMWH:n biologinen vaikutus insuliinista riippuvaiseen sokeritautiin (IDDM) NOD-hiirillä

NOD-kannan hiiret kehittävät itsestään tyypin I insuliinista riippuvaisen sokeritaudin (IDDM), joka on hyväksytty malli ihmisen IDDM:lle (Castano, L. ja Eisenbarth, G.S., Annu. Rev. Immunol. (1990) 8: 647-679). Sairaus alkaa 4-5 viikon ikäisenä haimasaarekkeen tulehduksen ilmaantumisella, haimasaarekkeiden tulehdus. Haimasaarekkeiden tulehdus tuhoaa asteittain insuliinia-tuottavat beta-solut, jotka ovat herkkiä TNF-α-tuholle. Noin 4-5 kk ikäisinä on tuhottu riittävä määrä beta-soluja, niin että sokeritauti tulee peittelemättömäksi.

Jotta testataan, voisiko LMWH-käsittely vaikuttaa IDDM-prosessiin, käsiteltiin 10 naaraspuolisen NOD-hiiren ryhmä viikottaisilla 5 µg/hiiri Fragmin$^R$ (panos 38609) ihonalaisilla injektioilla, annos määritettiin edustamaan 12 hiiriyksikköä/kg. 10 hiiren kontrolliryhmää käsiteltiin suolaliuosinjektioilla. 5 kk ikäisinä kaikista hiiristä otettiin verta määrittämään IDDM:n kehitys käyttämällä standardimenetelmää (Elias, D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1990) 87: 1576-1580). Kuvio 7 osoittaa, että kontrollihiirillä ("ei yhtään") oli epänormaali verenglukoosi (400 mg/dl). Päinvastoin

hiirillä, joita käsiteltiin LMWH:lla, oli normaali verenglukoosi (100 mg/dl). Täten käsittely LMWH:lla voi todella parantaa IDDM-prosessin.

Esimerkki 10

Ihmisen DTH:n LMWH-käsittely

Kuvio 8 osoittaa kokeen, jossa 40 vuotiaalta miespuoliselta vapaaehtoiselta, joka painaa 85 kg, testattiin DTH-reaktiivisyys tetanus-antigeenille (Merieux ihotestiasetin). Noin 18 mm kovettuma mitattiin 24 ja 48 h:ssa. Sitten vapaaehtoista käsiteltiin ihonalaisella Fragmin$^{R}$- (panos 38609) injektiolla, 3 mg. 5 d myöhemmin vapaaehtoiselta testattiin jälleen hänen DTH-vasteensa tetanukseen ja kovettuma inhiboitiin noin 5 mm:iin. Vapaaehtoiselta testattiin jälleen DTH 3 viikkoa myöhemmin ("selviytyminen") ja testi osoitti positiivisen reaktiivisyyden (23 mm kovettuma 24 ja 48 h:ssa). Sitten vapaaehtoista käsiteltiin Fragmin$^{R}$:llä kuten aikaisemmin ja DTH-reaktiivisyys mitattiin jälleen 7 d myöhemmin ("7 d jälkeen"). Jälleen DTH inhiboitiin noin 5 mm kovettumaksi. DTH:n selviytyminen havaittiin jälleen 3 viikoa myöhemmin. Täten LMWH annoksena vähemmän kuin 5 mg voi inhiboida DTH:ta ihmisissä 5 ja 7 d käsittelyvälein.

Ammattimiehille pitäisi olla ilmeistä, että muita koostumuksia ja menetelmiä, joita ei erityisesti ole esitetty tässä yksityiskohtaisessa esityksessä, siitä huolimatta siihen liittyen otetaan huomioon. Sellaisia muita koostumuksia ja menetelmiä tarkastellaan tämän keksinnön ulottuvuudessa ja hengessä. Siksi keksintöä ei pitäisi rajoittaa tässä esitetyillä spesifisillä suoritusmuodoilla vaan vain seuraavilla patenttivaatimuksilla.

Patenttivaatimukset

1. Farmaseuttinen koostumus estämään ja/tai hoitamaan patologisia prosesseja, joihin liittyy TNF-α-erityksen induktio koostuen farmaseuttisesti hyväksyttävästä aktiivisesta kantajasta ja pienimolekyylipainoisesta hepariinista (LMWH), jota on pienenä tehokkaana annosyksikkönä annettavaksi noin 5-8 d välein ja mikä LMWH kykenee inhiboimaan in vitro TNF-α-eritystä lepäävillä T-soluilla ja/tai makrofaageilla vasteena T-solu-spesifisille antigeeneille, mitogeeneille, makrofaagiaktivaattoreille, revenneelle solunulkopuoliselle matriisille (dECM), lamiinille, fibronektiinille tai muille ECM-komponeteille.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen farmaseuttinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että LMWH:n keskimääräinen molekyylipaino on noin 3000 - noin 6000.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen farmaseuttinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että annosyksikkö on tehokas annosyksikkö annettavaksi joka 5. päivä.

4. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen farmaseuttinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että annosyksikkö on tehokas annosyksikkö annettavaksi joka 7. päivä.

5. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen farmaseuttinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että mainittua LMWH:ta karakterisoidaan edelleen kykenevän inhiboimaan kokeellista viivästyneen tyyppistä liikaherkkyys- (DTH) reaktioita.

6. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen farmaseuttinen koostumus annettavaksi ihonalaisesti tai laskimonsisäisesti.

7. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen farmaseuttinen

koostumus, joka on tehokas viivästyttämään tai estämään allograftista hylkimistä.

8. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen farmaseuttinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että mainittuihin patologisiin prosesseihin kuuluu autoimmuunisairaudet, allergia, tulehdukselliset sairaudet ja muut läheisesti yhteenkuuluvat patologiset prosessit sen lisäksi.

9. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen farmaseuttinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että mainitut patologiset prosessit liittyvät AIDS:iin.

10. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen farmaseuttinen koostumus hoitamaan sokeritauti tyyppi I:tä, hammasta ympäröivää sairautta, tulehduksellista suolisairautta, silmän keskikalvon tulehdusta, reumaattisia sairauksia tai multippeliskleroosia.

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen farmaseuttinen koostumus hoitamaan nivelreumaa.

12. Patenttivaatimuksen 8 mukainen farmaseuttinen koostumus hoitamaan kroonista tulehdusta.

13. Patenttivaatimuksen 8 mukainen farmaseuttinen koostumus estämään ja/tai hoitamaan valtimon kovettumista, suonen tulehdusta ja läheisesti yhteenkuuluvia patologisia prosesseja sen lisäksi.

14. Patenttivaatimuksen 2 mukainen farmaseuttinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että mainittu LMWH on läsnä yksittäisenä alhaisena annosyksikkönä, joka on vähemmän kuin 5 mg.

15. Patenttivaatimuksen 2 mukainen farmaseuttinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että mainittu LMWH on

läsnä yksittäisenä alhaisena annosyksikkönä, joka on vähemmän kuin 3 mg.

16. Patenttivaatimuksen 2 mukainen farmaseuttinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että mainittu LMWH on läsnä yksittäisenä alhaisena annosyksikkönä, noin 0,3 - noin 3 mg.

17. Patenttivaatimuksen 2 mukainen farmaseuttinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että mainittu LMWH on läsnä yksittäisenä alhaisena annosyksikkönä, 1 - 1,5 mg.

18. Menetelmä, jossa käytetään pienimolekyylipainoista hepariinia (LMWH), joka kykenee inhiboimaan in vitro TNF-α-eritystä lepäävillä T-soluilla ja/tai makrofaageilla vasteena T-solu-spesifisille antigeeneille, mitogeeneille, makrofaagiaktivaattoreille, revenneelle solunulkopuoliselle matriisille (dECM), lamiinille, fibronektiinille tai muille ECM-komponenteille farmaseuttisen koostumuksen valmistamiseksi annettavaksi noin 5-8 d välein estämään farmaseuttisen koostumuksen annettavaksi noin 5-8 d välein estämään ja/tai hoitamaan patologisia prosesseja, joihin liittyy TNF-α-erityksen induktio, mihin sisältyy yhdistää alhainen tehokas annos mainittua LMWH:ta farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan kanssa.

19. Patenttivaatimuksen 18 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittua farmaseuttista koostumusta on tarkoitus antaa joka 7. päivä.

20. Patenttivaatimuksen 18 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainitun LMWH:n keksimääräinen molekyylipaino on noin 3000 - noin 6000.

21. Patenttivaatimuksen 18 mukainen menetelmä, t u n-

n e t t u siitä, että mainittu alhainen tehokas annos on vähemmän kuin 5 mg mainittua LMWH:ta.

22. Patenttivaatimuksen 18 mukainen menetelmä, t u n-
n e t t u siitä, että mainittuihin patologisiin prosesseihin sisältyy allograftinen hylkiminen, allergia, autoimmuuni- ja tulehdukselliset sairaudet.

23. Patenttivaatimuksen 18 mukainen menetelmä, t u n-
n e t t u siitä, että mainitut patologiset prosessit liittyvät AIDS:iin.

24. Patenttivaatimuksen 18 mukainen menetelmä, t u n-
n e t t u siitä, että mainitut patologiset prosessit liittyvät sokeritauti tyyppi I:een, hammasta ympäröivään sairauteen, tulehdukselliseen suolisairauteen, silmän keskikalvon tulehdukseen, reumaattisiin sairauksiin, kroonisiin tulehduksiin, multippeliskleroosiin, valtimon kovettumaan ja suonen tulehdukseen.

25. Farmaseuttinen koostumus annettaviksi noin 5-8 d välein estämään ja/tai hoitamaan patologisia prosesseja, joihin liittyy TNF-$\alpha$-erityksen induktio koostuen farmaseuttisesti aktiivisesta kantajasta ja pienimolekyylipainoisesta hepariinista (LMWH), jota on pienenä tehokkaana annoksena ja mikä LMWH kykenee inhiboimaan esiherkistetyn yksilön kokeellisesti viivästyneen tyyppiset liiallisen ärsykeherkkyyden (DTH) reaktiot annettavalle antigeenille, mikä on osoitettu kovettuman, joka havaittiin antigeenin iholle antamisen jälkeen 5-7 d farmaseuttisen koostumuksen antamisen jälkeen, vähenemisenä, verrattuna kovettumaan, joka havaittiin antigeenin iholle antamisen jälkeen mainitun farmaseuttisen koostumuksen puuttuessa tai sen antamisesta selviytymisen jälkeen.

26. Patenttivaatimuksen 25 mukainen farmaseuttinen

koostumus, t u n n e t t u siitä, että LMWH:n keksimääräinen molekyylipaino on noin 3000 - noin 6000.

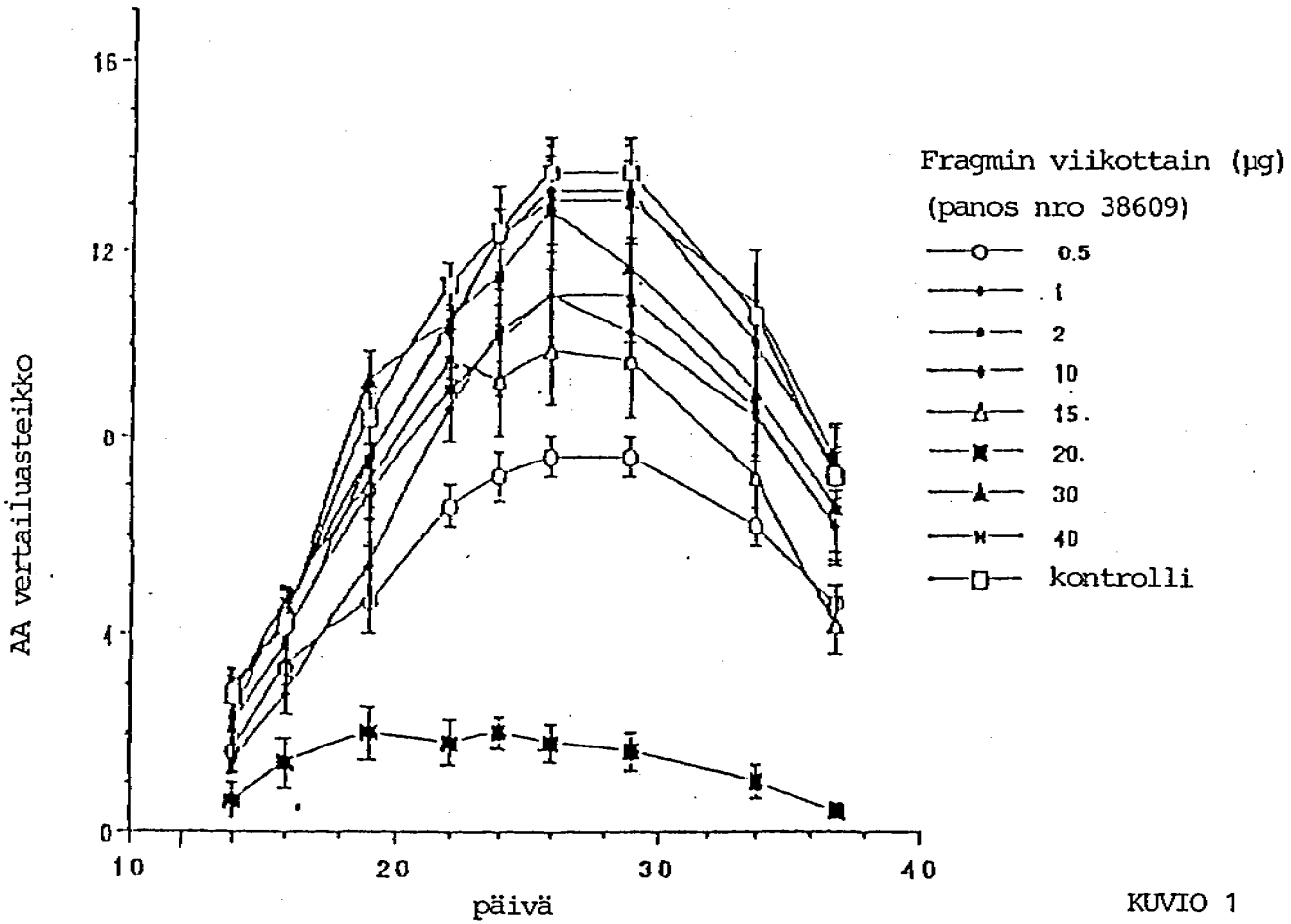
27. Patenttivaatimuksen 25 mukainen farmaseuttinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että mainittu antigeeni valitaan ryhmästä, joka koostuu tetanuksesta, myeliini emäsproteiinista, puhdistetusta proteiinijohdannaisesta ja oksatsolonista.

28. Menetelmä, jolla hoidetaan kohdetta, joka kärsii patologisesta prosessista, mihin sisältyy TNF-α-erityksen induktio, mihin sisältyy, että sellaiselle kohteelle annetaan patenttivaatimuksen 1, 2, 25 tai 26 mukaista farmaseuttista koostumusta noin 5-8 d välein.

29. Patenttivaatimuksen 28 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu väli antamisien välillä on 5 d.

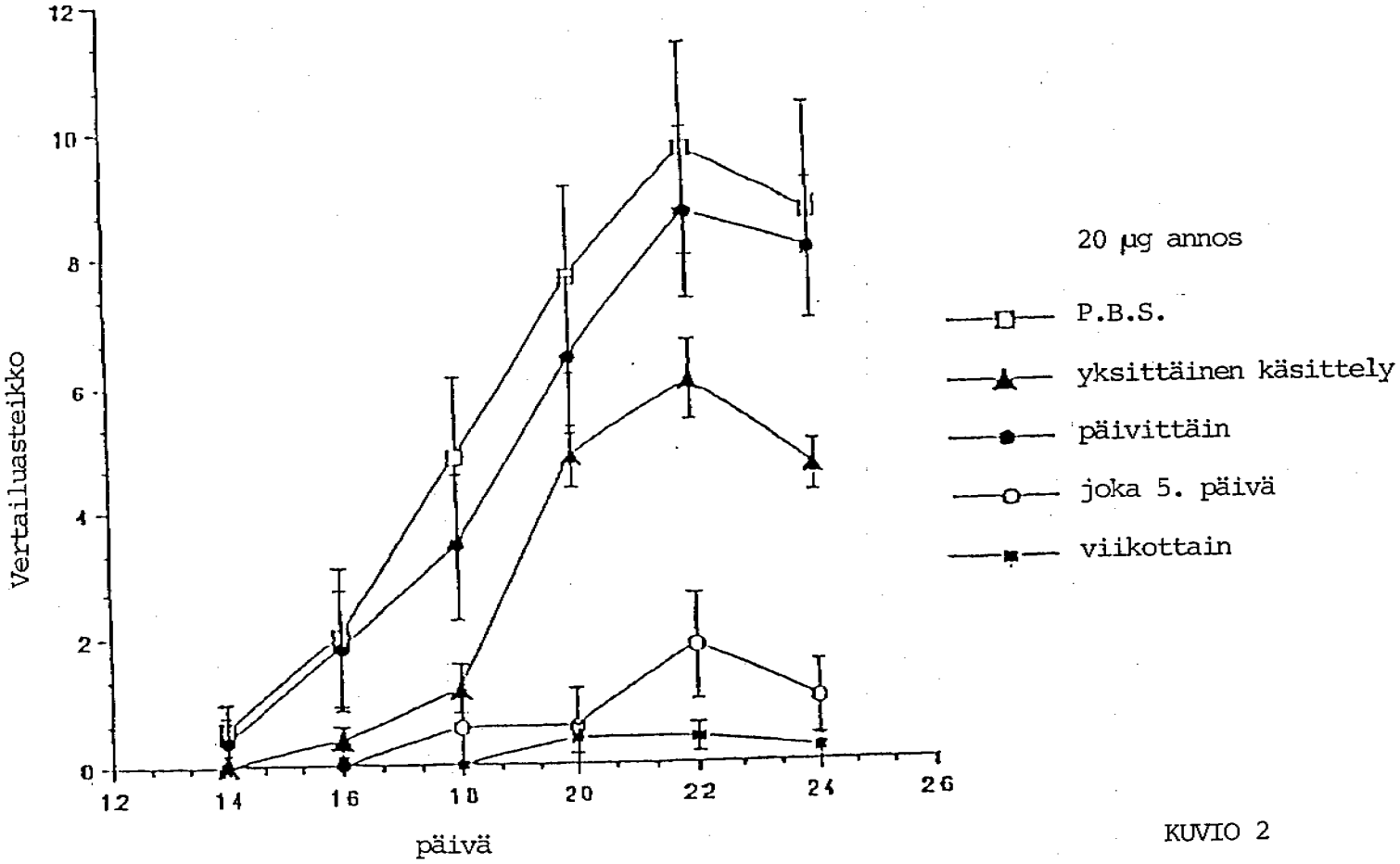
30. Patenttivaatimuksen 28 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu väli antamisien välillä on 7 d.

31. Patenttivaatimuksen 28 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainitussa farmaseuttisessa koostumuksessa on vähemmän kuin noin 5 mg mainittua LMWH:ta.


16
12
8
4
0
10
20
30
40
AA vertailuasteikko
päivä
Fragmin viikottain (µg)
(panos nro 38609)
0.5
1
2
10
15.
20.
30
40
kontrolli

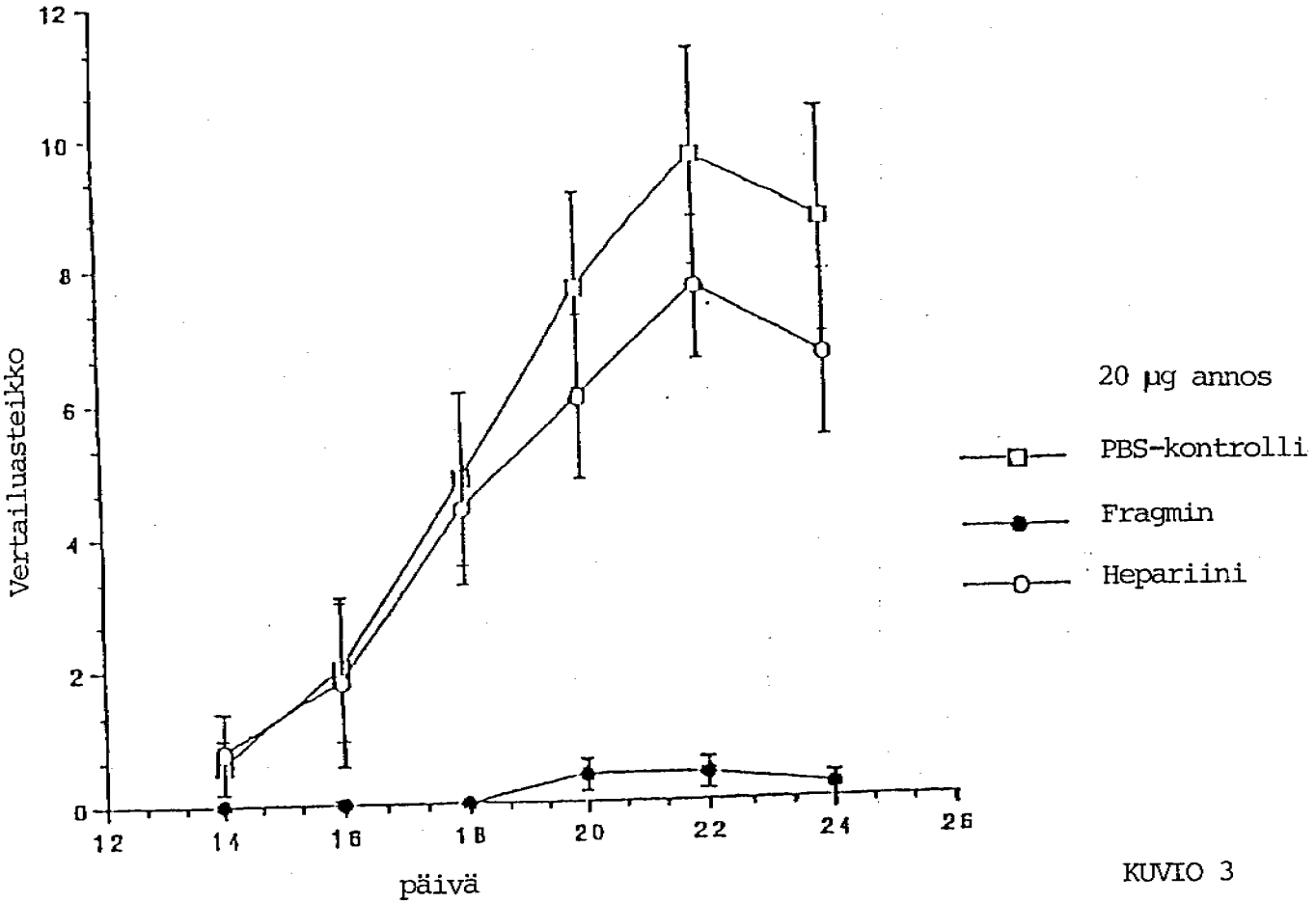
KUVIO 1

Fragminin (panos 38609) vaikutus AA:n kulkuun



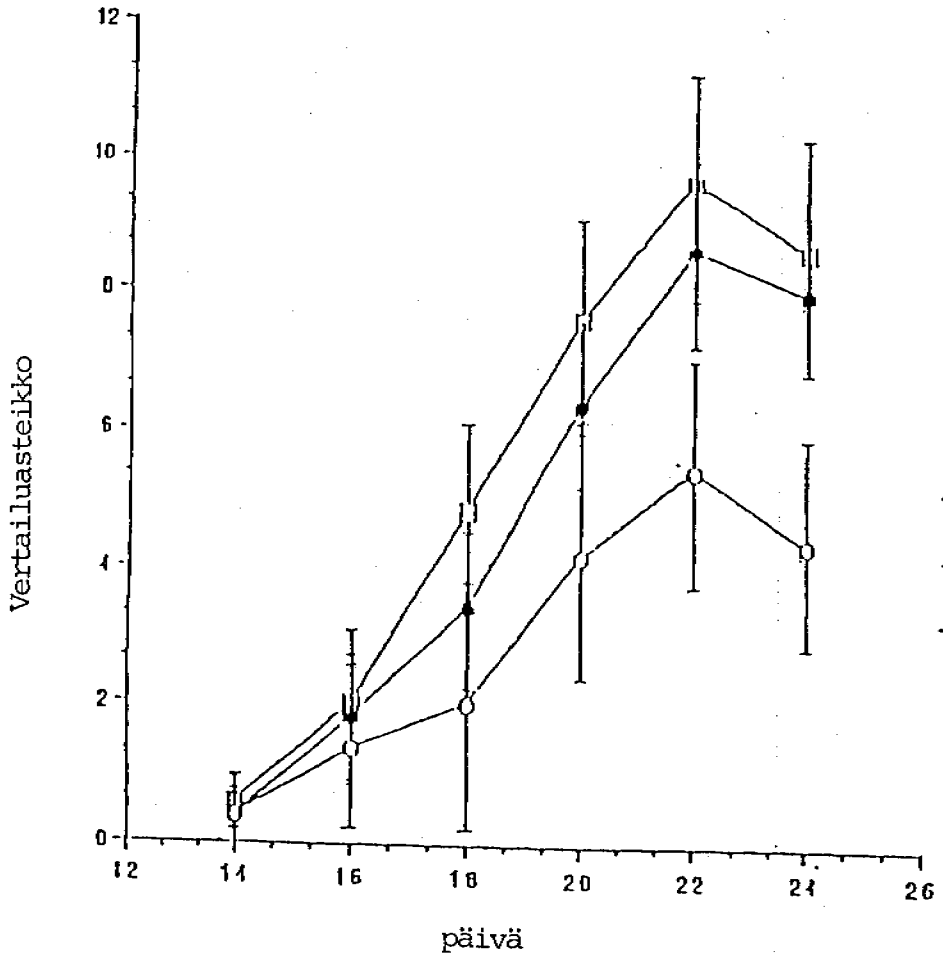

KUVIO 2

Viikottaisen Fragmin/Hepariinin vaikutus AA:han




KUVIO 3

Fragmin/Hepariinin vaikutus AA:han




20 µg annos

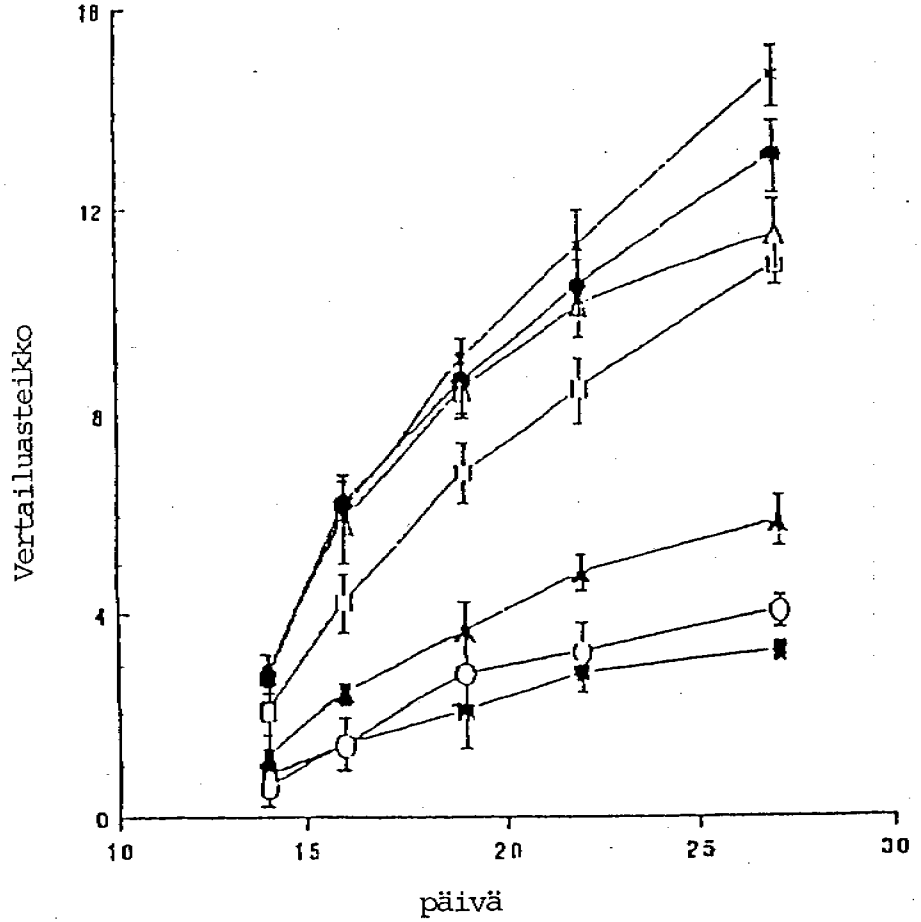
P.B.S.

Fragmin

Hepariini

KUVIO 4

AA-käsittely pienimolekyylipainoisilta hepariineilta




20 µg annos

kontrolli

Fragxiparin viikottain

Fraxiparin päivittäin

Fraxiparine viikottain

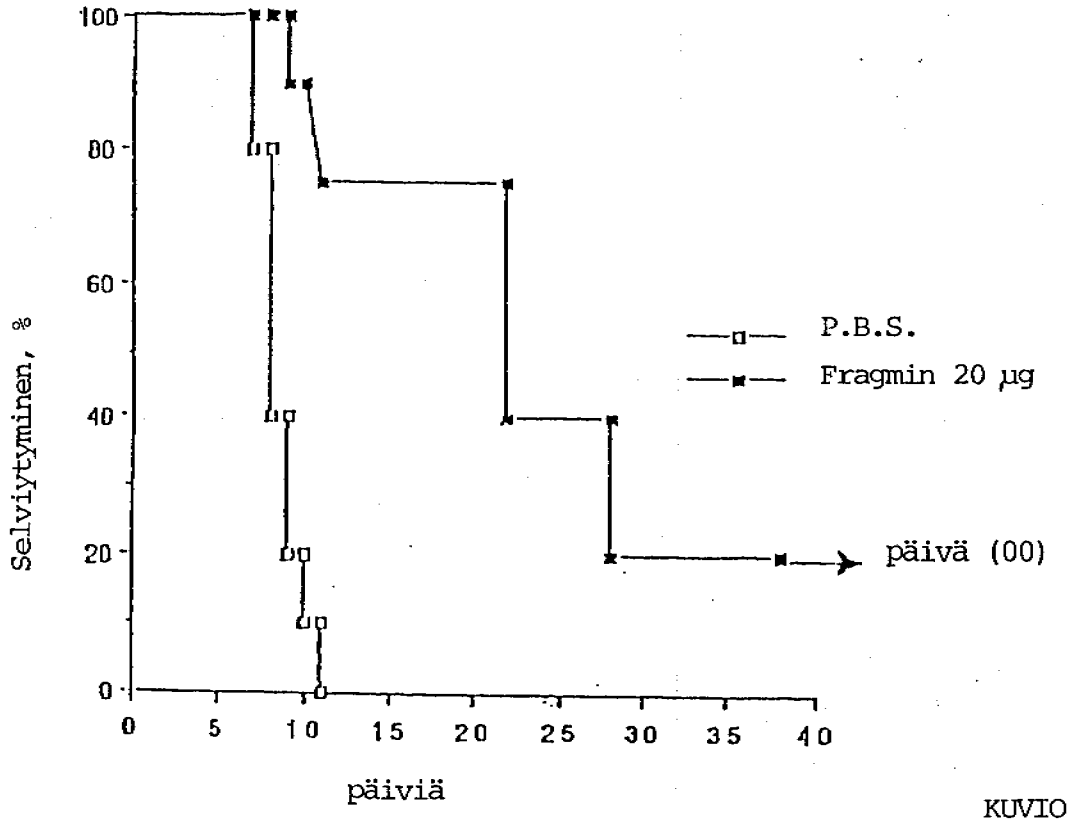
Fraxiparine päivittäin

Lovenox viikottain

Lovenox päivittäin

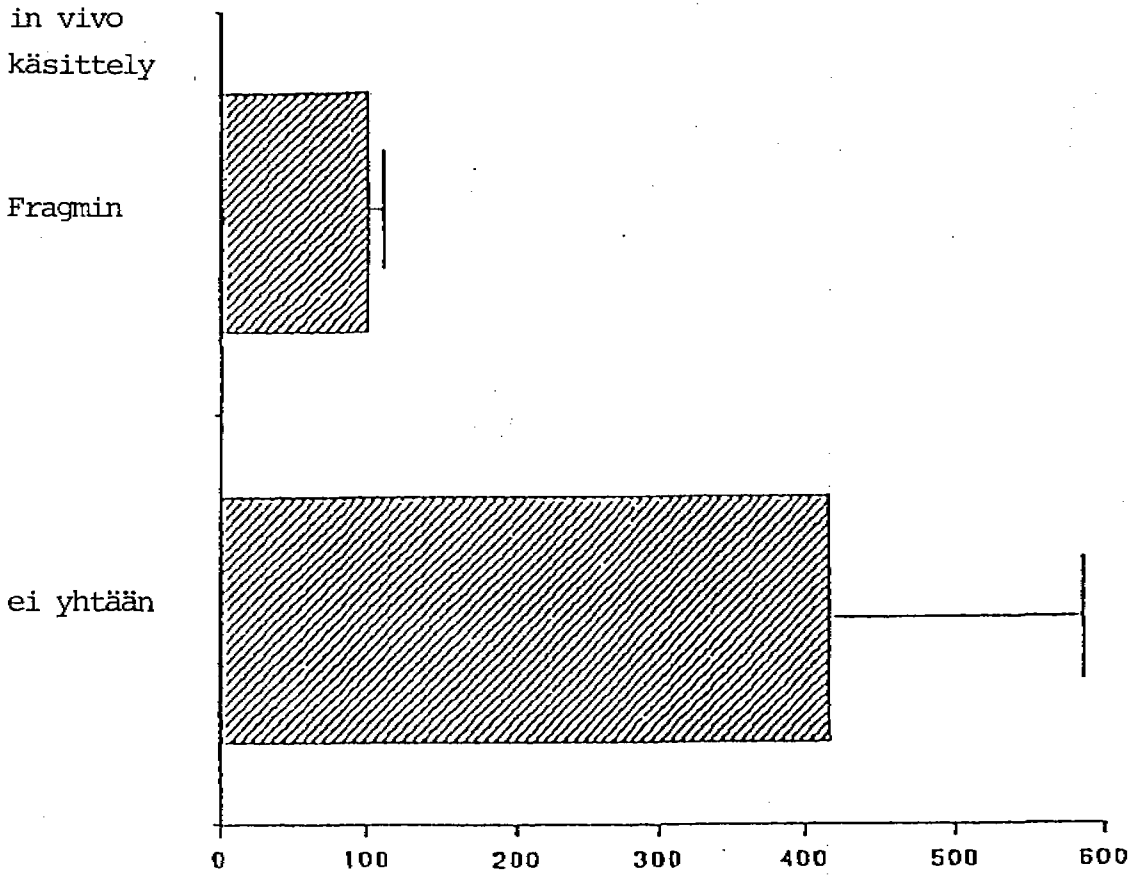
KUVIO 5

Rotan allogeeninen sydänsiirrännäinen

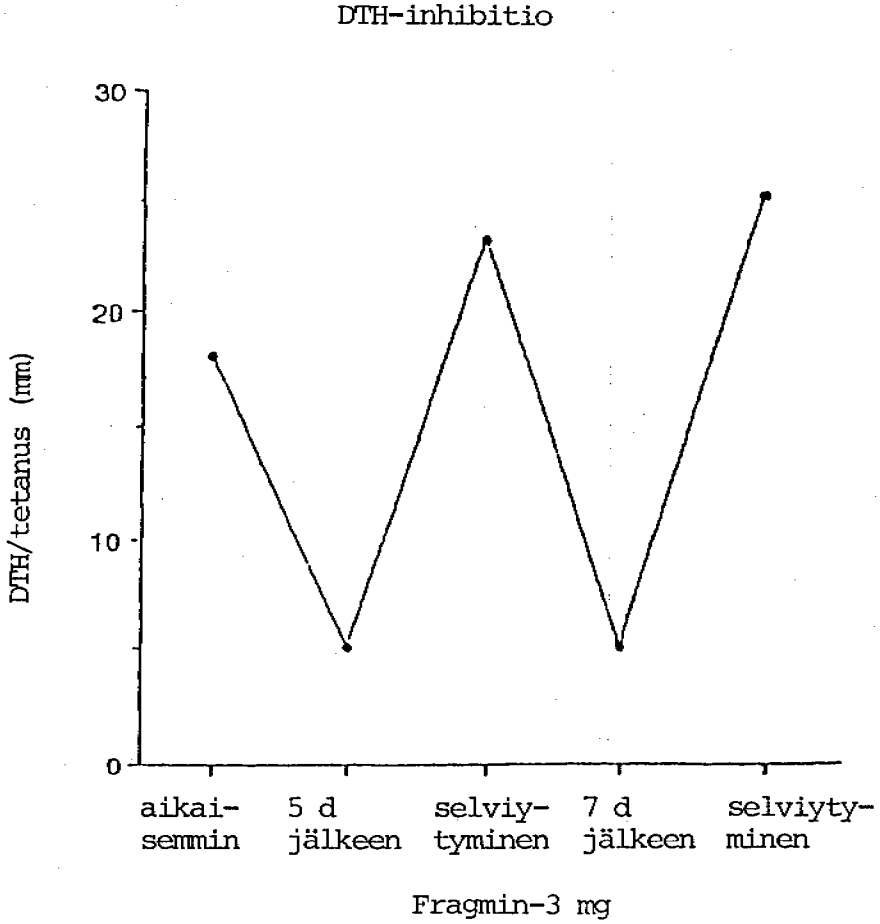



KUVIO 6

Fragmin-käsittely pysäyttää IDDM:n spontaanisti NOD-hiirissä




KUVIO 7


DTH-inhibitio
30
20
10
0
DTH/tetanus (mm)
aikai-
semmin
5 d
jälkeen
selviy-
tyminen
7 d
jälkeen
selviyty-
minen
Fragmin-3 mg

KUVIO 8